



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Biologisk variation av urinprotein och urinkreatinin hos friska hundar

Frida Mårtensson

*Uppsala
2017*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2017:36*

Biologisk variation av urinprotein och urinkreatinin hos friska hundar

Biological variation of urine protein and urine creatinine in healthy dogs

Frida Mårtensson

Handledare: Inger Lilliehöök, institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Katja Höglund, institutionen för anatomi, fysiologi & biokemi

Examinator: Anna Svensson, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Delnummer i serie: Examensarbete 2017:36

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *Urinprotein, urinkreatinin, kvot, variation, individ, analys, imprecision, individualitet, kvalitetsmål.*

Key words: *Canine, urine protein, urine creatinine, ratio, within-subject, intra-individual, between-subject, inter-individual, variation, analytical, imprecision, index of individuality, reference change value, critical change value, quality goals.*

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Data på biologisk variation är viktiga för att veta hur användbara populationsbaserade referensintervall är, för att tolka betydelsen av förändringar i upprepade prover från samma individ, samt för att sätta analytiska kvalitetsmål. Inga studier har tidigare publicerats där den biologiska variationen av urinprotein och urinkreatinin hos hund har undersökts. Denna studie undersökte den biologiska variationen av urinprotein och urinkreatinin samt kvoten mellan dem (urinprotein/urinkreatinin-kvoten, UPC) i urinprov tagna 2 gånger per vecka i 5 veckor från 10 kliniskt friska hundar. Proverna frystes in och analyserades i duplikat i en analysomgång, och resultaten användes för att uppskatta storleken av biologisk variation inom individen (CV_I), mellan individer (CV_G), samt analysvariationen (CV_A). Utifrån detta räknades sedan Indices of Individuality, Reference Change Values (RCV) samt analytiska kvalitetsmål för CV_A ut. Den biologiska variationen var störst för urinprotein men i samma storleksordning för samtliga variabler. Mer specifikt var CV_I för samtliga variabler 20 till 28%, CV_G 15-33% och CV_A 3-6%. Index of individuality var högt för urinkreatinin men intermediärt för urinprotein och lågt för urinprotein/urinkreatinin-kvoten, vilket indikerade att medan populationsbaserade referensintervall är lämpliga för urinkreatinin är de av mindre nytta för urinprotein och av begränsat värde för UPC. När möjligt kan därför istället RCV användas för att utvärdera urinprotein och UPC, och resultaten indikerar att relativt stora förändringar (nära eller över 50%) mellan två på varandra följande prover krävs för att indikera en signifikant skillnad.

SUMMARY

Data on biological variation are important in order to know how useful population-based reference values are, to interpret the importance of differences between two consecutive tests from the same individual and to set analytical quality goals. No studies have previously been published on the biological variation of urine protein and urine creatinine in dogs. This study investigated the biological variation of urine protein and urine creatinine and the ratio between them (urine protein-to-urine creatinine ratio, UPC) in urine samples taken twice weekly for 5 weeks from 10 clinically healthy dogs. The samples were frozen and analysed in duplicate in a single analytical run, and the results were used to assess the biological variation within subjects (CV_I), between subjects (CV_G), and the analytical variation (CV_A). These data were then used to calculate Indices of Individuality, Reference Change Values (RCVs) and analytical quality goals for CV_A . The biological variation were of the same order of magnitude for all variables, but largest for urine protein. Specifically, CV_I was for all variables 20 to 28%, CV_G 15-33% and CV_A 3-6%. Index of individuality was high for urine creatinine but intermediary for urine protein and low for the urine protein-to-urine creatinine ratio, indicating that while population-based reference values are appropriate for urine creatinine, they are of less use for urine protein and of limited use for UPC. Therefore, when possible RCV can instead be used to evaluate urine protein and UPC, and the results indicate that relatively large changes between two consecutive tests (near or above 50%) are necessary to indicate a significant difference.

INNEHÅLL

Förkortningar	1
Inledning.....	2
Litteraturoversikt	3
Protein och kreatinin i urin.....	3
Biologisk variation	3
Användningsområden för data på biologisk variation	4
Användbarhet av populationsbaserade referensintervall	4
Betydelsen av förändringar i upprepade prover	5
Bestämning av analytiska kvalitetsmål.....	5
Tidigare publicerad data på biologisk variation	6
Material och metoder	8
Hundarna	8
Studiedesign	8
Databehandling och statistisk analys	9
Resultat	10
Hundarna	10
Biologisk variation	10
Diskussion	13
Referenser.....	19

FÖRKORTNINGAR

CV_I: Variation inom individen (eng: within-subject variation)

CV_G: Variation mellan individer (eng: between-subject variation)

CV_A: Analytisk variation, imprecision (eng: analytical variation)

IND_I: Index of Individuality

RI: Referensintervall

RCV: Reference Change Value

UPC: Urinprotein/urinkreatinin-kvot

INLEDNING

Biologisk variation kan beskrivas som slumpmässig variation runt ett värde kroppen försöker upprätthålla, och består dels av variation inom individen (CV_I), dvs skillnader hos samma individ mellan olika tillfällen, och dels av variation mellan individer (CV_G) (Fraser, 2004). Till skillnader i uppmätta värden tillkommer utöver dessa biologiska skillnader också en analytisk variation eller imprecision, CV_A (Fraser, 2004). Det finns flera användningsområden för data på biologisk variation, huvudsakligen att utvärdera hur användbara populationsbaserade referensvärden är för den aktuella variabeln, att utvärdera betydelsen av förändringar i upprepade prover från samma individ, samt att sätta analytiska kvalitetsmål (Fraser & Harris 1989).

Friska hundar utsöndrar endast små mängder protein i urinen (IRIS, 2013), och en onormalt stor mängd protein i urinen, dvs proteinuri, kan vara en tidig markör för njurskada (Cianciolo *et al.*, 2016). Koncentrationen av protein i urin påverkas dock av hur utspädd urinen är (DiBartola & Westropp, 2014). För att få ett mått på graden av proteinuri används därför inte koncentrationen av urinprotein direkt, utan istället kvoten mellan urinprotein och urinkreatinin (DiBartola & Westropp, 2014).

I denna studie undersöktes den biologiska variationen på protein och kreatinin i urinen hos friska hundar, med syftet att ta fram data på den biologiska variationen. Resultaten användes sedan också för att ta fram indices of individuality, reference change values samt för att generera analytiska kvalitetsmål för CV_A . Index of individuality är ett objektiva mått på hur mycket den biologiska variationen skiljer sig åt mellan olika individer, och används för att utvärdera hur användbara populationsbaserade referensintervall är (Fraser, 2004). Reference change values är individbaserade referensvärden och används för att utvärdera betydelsen av förändringar i upprepade prover från samma individ (Fraser, 2004; Walton, 2012).

I arbetet har vedertagna engelska termer använts i de fall vedertagna eller rimliga svenska översättningar saknas, för att undvika förvirring kring terminologin.

LITTERATURÖVERSIKT

Protein och kreatinin i urin

Urinen hos friska hundar innehåller endast små mängder protein (IRIS, 2013). Detta beror på att friska njurar förhindrar förlust av protein via urinen, dels med hjälp av den glomerulära filtrationsbarriären och dels med hjälp av epitelceller i proximala tubuli. Mer precist sker detta genom att den glomerulära filtrationsbarriären stoppar större delen av proteinerna i blodet och huvudsakligen släpper igenom proteiner med låg molekylärvikt, samt genom att epitelcellerna i proximala tubuli resorberar majoriteten av de proteiner som normalt sett ändå kommer ut i primärurinen (IRIS, 2013). Vid njurskada försämras dessa mekanismer vilket ger upphov till proteinuri (D'Amico & Bazzi, 2003), det vill säga en onormalt stor mängd protein i urinen (Lees *et al.*, 2005). Proteinuri kan även orsakas av annat, såsom sjukdomar eller inflammation i urin- eller könsvägar (Lees *et al.*, 2005), men en persisterande renal proteinuri är en tidig markör för njurskada hos hund (Cianciolo *et al.*, 2016).

Ett konsensusuttalande från American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) beskriver detaljerade utredningssteg av proteinuri för att fastställa om den kommer från njurarna samt i så fall var i njurarna felet sannolikt sitter, det vill säga om proteinurin är glomerulär, tubulär eller interstitiell (Lees *et al.*, 2005). I denna utredningsgång ingår att använda urinprotein/urinkreatinin-kvoten (UPC) för att få ett mått på storleken av proteinförlust (Lees *et al.*, 2005).

Kreatinin bildas i kroppen i nära konstant hastighet proportionerligt till framförallt muskelmassan (IRIS, 2015). Det bildas främst i musklerna, genom att kreatin och fosfokreatin omvandlas till kreatinin i en irreversibel process. Det filtreras fritt i glomeruli och sedan sker varken betydelsefull resorption eller sekretion (IRIS, 2015). Koncentrationen av kreatinin i urinen påverkas dock inte bara av mängden kreatinin i urinen utan också av hur koncentrerad själva urinen är, dvs om urinen är utspädd blir koncentrationen av kreatinin lägre (DiBartola & Westropp, 2014). På samma vis påverkas urinproteinkoncentrationen inte bara av hur mycket protein som faktiskt utsöndras utan även av hur utspädd urinen är. Därför ger mätning av urinproteinkoncentrationen i ett enstaka urinprov inte ett mått på storleken av proteinförlust. Kvoten mellan urinprotein och urinkreatinin (UPC) påverkas däremot inte på detta vis, varför just UPC istället för urinproteinkoncentrationen används för att ge ett mått på storleken av proteinuri (McCaw *et al.*, 1985; DiBartola & Westropp, 2014).

Biologisk variation

Biologiska variabler är inte konstanta, utan alla variabler har en inneboende variation (Fraser, 2004). Vissa variationer beror på ålder och det är då lämpligt att jämföra värden från en viss individ enbart med relevant åldersgrupp, dvs att använda referensvärden indelade efter ålder. Andra variationer är cykliska, t.ex. progesteron vilket stiger efter ägglossning och sjunker när gulkroppen bryts ned; detta måste tas hänsyn till vid mätning av en variabel som uppvisar sådan cyklicitet (Fraser, 2004). De flesta variabler uppvisar dock inte sådan cyklicitet, utan istället en mer slumpmässig variation (Fraser & Harris, 1989). Denna variation benämns vanligen

biologisk variation och kan beskrivas som en slumpmässig variation kring ett homeostatiskt målvärde, det vill säga en slumpmässig variation kring ett värde kroppen försöker upprätthålla (Fraser, 2004). Denna slumpmässiga variation finns inom individen (CV_I) så att upprepade prover från samma individ inte kommer att visa samma värde, men den finns också mellan individer (CV_G) vilket kan sägas bero på att olika individer har olika homeostatiska målvärden. Till skillnader i uppmätta värden tillkommer utöver dessa biologiska skillnader också en analytisk variation eller imprecision, CV_A (Fraser, 2004). Att på ett korrekt sätt kunna tolka provresultat kräver kunskap både om vilken sorts variation som ingår i resultatet, och dess storlek (Ricós *et al.*, 2004).

Användningsområden för data på biologisk variation

Användbarhet av populationsbaserade referensintervall

Referensvärden utgörs vanligen av referensintervall motsvarande 95% av en frisk referenspopulation (Friedrichs *et al.*, 2012). Dock är dessa populationsbaserade referensintervall (RI) av begränsat värde för många variabler, beroende på att den genomsnittliga variationen inom individen (CV_I) är mindre än variationen mellan individer (CV_G) för den aktuella variabeln; detta gör att stora avvikelser från individens normala eller friska värden kan förekomma utan att värdena hamnar utanför det populationsbaserade RI (Fraser, 2004). När CV_I är mindre än CV_G är populationsbaserade RI således av begränsat värde, och variabeln sägs ha hög grad av individualitet (engelska: individuality), det vill säga skillnaden mellan individer är stor. Däremot har populationsbaserade RI hög användbarhet om CV_I är större än CV_G , då graden av individualitet är låg. Ett objektiva mått på detta är Index of individuality (IND_I), vilket genereras av formeln $IND_I = (CV_I^2 + CV_A^2)^{1/2}/CV_G$ (Harris, 1981; Fraser, 2004). Formeln förkortas ofta till $IND_I = CV_I/CV_G$, eftersom det är vanligt att CV_I är större än imprecisionen (CV_A) med moderna analysmetoder (Fraser, 2004). I de fall IND_I är högt ($IND_I > 1,4$) har variabeln (något kontraintuitivt) låg individualitet, det vill säga skillnaderna mellan individer är små, och populationsbaserade RI har hög användbarhet (Fraser & Harris, 1989; Fraser, 2004). Är IND_I däremot lågt ($IND_I < 0,6$) finns en markant individualitet, dvs stor skillnad mellan individer, och populationsbaserade referensintervall har låg användbarhet (Fraser & Harris, 1989; Fraser, 2004). Om IND_I ligger mellan 0,6 och 1,4 kan populationsbaserade referensintervall användas med vetskap om att förändringar inte upptäcks lika väl som i de fall $IND_I > 1,4$ (Walton, 2012). Ett sätt att öka IND_I för en viss variabel, och därmed användbarheten av populationsbaserade RI för den variabeln, kan vara stratifiering till subpopulationer (Fraser, 2004). Dessa subpopulationer kan baseras på t.ex. kön, ålder eller ras (Fraser, 2004; Walton, 2012); Walton (2012) använder det hypotetiska exemplet blodplätttskoncentration hos hund där stratifiering så att Cavalier King Charles spaniel får sitt eget populationsbaserade RI skulle kunna tänkas ge högre IND_I för både dem och den andra subpopulationen (det vill säga alla övriga hundraser), beroende på att asymptomatisk makrotrombocytopeni är vanligt förekommande inom Cavalier King Charles spaniel-rasen (Pedersen *et al.*, 2002; Cowan *et al.*, 2004).

Betydelsen av förändringar i upprepade prover

Det är, som noterats ovan, vanligt att populationsbaserade RI har begränsad användbarhet för att hitta avvikelser från en individs vanliga värden (Fraser, 2004). Ett lämpligt alternativ till populationsbaserade RI för variabler med hög grad av individualitet är individbaserade RI (Fraser, 2004), eller Reference Change Values (RCV) (Walton, 2012). Reference change value definieras som "den skillnad mellan 2 på varandra följande provresultat hos en individ som är statistiskt signifikant i en given andel av alla liknande personer" (Harris & Yasaka, 1983), och kan således användas för att identifiera en skillnad mellan 2 provresultat som är statistiskt signifikant, och därmed sannolikt motsvarar en reell biologisk förändring och inte en slumpmässig variation, även i de fall båda provresultaten ligger inom det populationsbaserade RI (Walton, 2012). RCV beräknas med formeln $RCV = 2^{1/2} * Z * (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$, där Z väljs utifrån önskvärd sannolikhet; t.ex. väljs ofta 95% sannolikhet ($P < 0.05$) (Fraser, 2001). Detta ger Z-värdet 1,96 om förändringar i båda riktningar är intressanta, vilket är vanligt. Z-värde för önskad sannolikhet, och en eller två riktningar (uni- respektive bilateralt), kan hämtas ur statistiska tabeller för detta. Formeln ger ett värde på RCV i procent som sedan kan jämföras med den procentuella skillnaden mellan två aktuella prover från samma individ. Om förändringen mellan proverna är större än RCV är förändringen signifikant med 95% sannolikhet (om Z-värde för 95% sannolikhet användes). RCV baseras således på CV_I samt på CV_A ; värden på CV_I kan hämtas ur publikationer på biologisk variation, under förutsättning att sådana publikationer finns för aktuell variabel (Fraser, 2001), medan CV_A fastställs i varje laboratoriums interna kontroll och därför kan variera (Ricós *et al.*, 2004).

Formeln för RCV kan, om den arrangeras om, också användas till att för två faktiska värden räkna ut sannolikheten att skillnaden är signifikant (Fraser, 2001). Detta kan vara relevant t.ex. i en situation där den faktiska skillnaden är mindre än RCV och således inte signifikant med exempelvis 95% sannolikhet. Det är då fortfarande möjligt att det är relativt hög sannolikhet att skillnaden är signifikant, t.ex. 80%, vilket kan vara av intresse att veta om i den kliniska situationen även om det inte når upp till 95% sannolikhet. För att räkna ut denna sannolikhet arrangeras formeln om till $Z = \text{Skillnaden} / (2^{1/2} * (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2})$, där skillnaden är den procentuella skillnaden mellan de två aktuella värdena. Det uträknade Z-värdet kontrolleras sedan mot en tabell med Z-värden för att se vilken sannolikhet det motsvarar (Fraser, 2001).

Bestämning av analytiska kvalitetsmål

Med analytiska kvalitetsmål menas prestandakrav för analysarbete på laboratorium, t.ex. gällande vad en viss analysmetods maximala CV_A får vara (Fraser & Harris, 1989). Det finns flera olika metoder för att bestämma analytiska kvalitetsmål, och vid en konferens i Stockholm år 1999 om strategier för att sätta globala analytiska kvalitetsmål föreslogs en rangordning av dessa metoder (Kenny *et al.*, 1999). Att basera analytiska kvalitetsmål på biologisk variation är en metod som hamnar högt i rangordningen och anses ha hög grad av klinisk relevans (Kenny *et al.*, 1999; Kjelgaard-Hansen & Jensen, 2010).

De analytiska målen för CV_A , baserade på biologisk variation, har föreslagits enligt följande: Optimal prestanda är $CV_{OPT} < 0,25 * CV_I$, vilket som mest ger 3% ökad variabilitet, dvs mindre än 3% variabilitet från CV_A läggs till den sanna variabiliteten från CV_I (Fraser *et al.*, 1997). Denna formel används för att generera analytiska mål för de variabler där den önskvärda prestandan uppnås med lätthet med dagens teknik och metoder. Enligt flera författare är önskvärd prestanda $CV_{DES} < 0,5 * CV_I$ (Cotlove *et al.*, 1970; Fraser *et al.*, 1997). Detta ökar den uppmätta variabiliteten med mindre än 12%. De analytiska målen som denna formel genererar anses kunna gälla generellt (Fraser *et al.*, 1997). Lägsta acceptabla prestanda är $CV_{MIN} < 0,75 * CV_I$, vilket som mest ger 25% ökad variabilitet. Denna formel kan användas för att generera analytiska mål för de variabler där den önskvärda prestandan inte kan uppnås med dagens metoder och teknik (Fraser *et al.*, 1997).

Tidigare publicerad data på biologisk variation

Data på biologisk variation finns samlad i databaser på internet, för både människor (westgard.com/biodatabase1) och andra djur (VetBiologicalVariation.org). Databasen för människor har nyligen fått kritik, bland annat på grund av att majoriteten av variablerna grundas på endast en studie vilken i många fall är relativt gammal, och för att studierna som ligger till grund för databasen håller mycket varierande kvalitet (Carobene, 2015). En arbetsgrupp inom European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, EFLM, har tagit fram en checklista för studier av biologisk variation (Bartlett *et al.*, 2015) och en annan arbetsgrupp arbetar med att ta fram en ny, uppdaterad databas (EFLM, 2016).

Såvitt denna författare kunnat identifiera, finns för hund inga publicerade studier där den biologiska variationen av kreatinin eller protein i urin har undersökts. Dock finns studier på kreatinin och protein i blod på hund (Leissing *et al.*, 1985, se: VetBiologicalVariation.org, 2015; Jensen & Aaes, 1993, se: VetBiologicalVariation.org, 2015; Pagitz *et al.*, 2007; Ruaux *et al.*, 2012) samt studier på kreatinin och protein i urin hos människor (Shephard *et al.*, 1981; Gowans & Fraser, 1987;1988; Ricós *et al.*, 1994).

Gällande den biologiska variationen av kreatinin i blod hos hund har flera studier undersökt detta (Leissing *et al.*, 1985, se: VetBiologicalVariation.org, 2015; Pagitz *et al.*, 2007; Ruaux *et al.*, 2012). Resultaten och därifrån uträknade variabler har skilt sig en del, exempelvis har för IND_I resultaten varierat mellan att motsvara högt IND_I (indikerande att populationsbaserade RI är lämpliga), intermediärt IND_I och lågt IND_I (indikerande att populationsbaserade RI *inte* är lämpliga). En likartad situation föreligger för totalprotein i blod hos hund, där uträknade IND_I också varierat mellan att vara högt (Leissing., 1985, se: VetBiologicalVariation.org, 2015), intermediärt (Jensen & Aaes, 1993, se: VetBiologicalVariation.org, 2015) och lågt (Riaux *et al.*, 2012).

Det finns också flera studier gällande urinkreatinin (Gowans & Fraser, 1987;1988) eller både urinkreatinin och urinprotein (Shephard *et al.*, 1981; Ricós *et al.*, 1994) i urinen hos människor. Dessa studier har inte alltid tagit fram resultat i samma format, t.ex. har Shephard *et al.* (1981) inte räknat ut CV_I och CV_G (coefficients of variation) utan enbart varianserna V_I och V_G .

Ytterligare exempel på detta är att studierna använt olika formler för att ta fram ett objektivi mått på förhållandet mellan variation inom individen och mellan individer, dvs för att räkna ut IND_I eller motsvarande kvoter. De har också undersökt delvis olika typer av urinprov; samtliga studier har studerat prov där den totala urinmängden under 24 h (timmar) samlats in flera gånger över olika tidsperioder, medan Shephard *et al.* (1981) också undersökt variationen mellan enskilda prover samlade under 48 h (all urin under de 48 h samlad) och Ricós *et al.* (1994) också har undersökt variationen mellan enstaka urinprov, dels första morgonurinen och dels ett prov taget vid en slumpmässigt utvalt tid, samlade flera gånger över en tidsperiod. Enligt Fraser (2004) har den biologiska variationen i 24 h-urinprov inom individer (CV_I) varit lika i olika studier. Rapporterade CV_I och CV_G finns sammanställda i tabell 1, där det kan utläsas att värdena varierar mellan olika typer av urinprov. Uträkningar av IND_I eller motsvarande kvoter från dessa studier på människa varierar också och då även inom samma studie mellan olika typer av urinprov.

Tabell 1. Data på biologisk variation av kreatinin och protein i urin hos människor

Kreatinin				
	24h output	24h koncentration	Morgonurin	Slumpmässiga prov
CV_I (%)	13-15 ^{1,2}	24 ^{1,2}	31 ²	36 ²
CV_G (%)	28 ^{1,2}	25-34 ^{1,2}	26 ²	36 ²
Protein				
	24h output	24h koncentration	Morgonurin	Slumpmässiga prov
CV_I (%)	39 ²	39 ²	48 ²	51 ²
CV_G (%)	24 ²	33 ²	38 ²	44 ²

Källor: 1: Gowans & Fraser, 1988. 2: Ricós *et al.*, 1994. Med 24h output menas att resultatet anges som den totala mängden av variabeln som utsöndrats på 24 h, istället för att anges som koncentrationen av variabeln i urinen. Med slumpmässiga prov menas de enstaka prov som togs vid en slumpmässigt utvalt tid. CV_I = genomsnittlig biologisk variation inom individen. CV_G = biologisk variation mellan individer.

MATERIAL OCH METODER

Hundarna

I studien inkluderades 19 hundar. Studien är godkänd av Uppsala djurförsöksetiska nämnd och Jordbruksverket, etiskt tillstånd C 58/16, och samtliga djurägare hade gett sitt medgivande till att hundarna inkluderades i studien. För att få delta skulle hundarna vara mellan 1 och 10 år gamla, och friska enligt djurägarna. För att säkerställa att de deltagande hundarna var friska fick djurägarna fylla i ett formulär med frågor kring hundarnas hälsa, och hundarna fick genomgå en klinisk undersökning i början av studien samt en andra klinisk undersökning efter att alla urinprov samlats. Dessutom togs blodprover för hälsokontroll vid det första undersökningstillfället. Hundarna undersöktes på Universitetsdjursjukhuset (UDS) vid Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala, och proverna analyserades på klinisk kemiska laboratoriet vid UDS. I serum analyserades alaninaminotransferas (ALAT), albumin, C-reaktivt protein (CRP), fruktosamin, kreatinin och protein med Architect c4000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Hemoglobin, totalantal leukocyter och differentialräkning analyserades med Advia 2120 (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Tyskland). Mindre avvikelser som bedömdes sakna påverkan på studiens variabler accepterades. Vid den kliniska undersökningen utgjordes detta av t.ex. lindrig tandsten, mindre sår eller sårskorpor, och kutana nybildningar om de funnits under längre tid utan förändring, och gällande blodprovsvärden accepterades vissa mindre avvikelser som bedömdes sakna klinisk relevans. Hundarna fick stå på fästingprofylax men ingen annan form av kontinuerlig medicinering.

Studiedesign

Urinprov samlades av djurägarna i hundarnas hemmiljö, 2 gånger i veckan i 5 veckor. För vissa av hundarna gjordes uppehåll vid något av tillfällena då djurägarna hade förhinder. Dessa fick då lämna ytterligare ett prov på slutet så att det slutgiltiga antalet prover från varje hund var 10 stycken. Djurägarna instruerades att öva på urinprovstagning 3 gånger innan de började samla för inlämning, för att vänja hundarna vid situationen och minska preanalytisk variation. Hundarna fick mat och vatten enligt djurägarnas normala rutiner under studiens gång. Urin samlades vid första urineringen på morgonen och djurägarna lämnade sedan in respektive prov samma förmiddag.

Urinsticka och specifik vikt kontrollerades på varje prov som hälsokontroll samma dag som provet togs, varefter proven centrifugerades och supernatanten frystes in i -70 °C. Urinstickan lästes av maskinellt (Urisys 1100 urine analyzer, Roche Diagnostics, Basel, Schweiz). Efter centrifugering kontrollerades också urinsediment på de 2 första inlämnade proverna för respektive hund och sedan en gång i veckan om sedimentet såg bra ut de tidigare gångerna. För de hundar vars sediment innehöll blodkroppar av ett antal på gränsen till det acceptabla kontrollerades sediment varje gång så länge detta utseende på sedimentet kvarstod. Kontroll av urinsticka och sediment gjordes för att säkerställa att hunden var frisk och inte hade inflammation eller andra avvikelser i urinvägarna som kunde påverka resultaten.

Prov samlades in under september och oktober 2016. Vid analystillfället tinades proverna och varje prov fördelades till två provrör. Ordningen på alla provrör randomiserades innan analys av urinprotein och urinkreatinin (Architect c4000, Abbott Diagnostics, Lake Forest, IL, USA). Proverna analyserades således i duplikat i randomiserad ordning. Samtliga prover analyserades den 1:a november 2016, i en analysomgång. Även specifik vikt mättes i duplikat på proverna vid detta tillfälle, med en digital refraktometer (PAL-USG (DOG), Atago, Tokyo, Japan). Samtliga analyser gjordes vid klinisk kemiska laboratoriet vid UDS, SLU, Uppsala.

Databehandling och statistisk analys

Varianserna, dvs variansen mellan duplikat (motsvarar analytisk variation), variansen inom individer samt variansen mellan individer, uppskattades med hjälp av en mixed-effect model, med kommandot ”proc mixed” i ett kommersiellt tillgängligt statistikprogram (SAS 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Hund, provnummer och replikat definierades som slumpmässiga effekter, medan provresultaten definierades som utkomst-variabler. Normalfördelning och potentiella outliers utvärderades genom visuell inspektion av histogram och QQ-diagram av residualer. Varianserna konverterades sedan till sina korresponderande analytiska variation (CV_A), variation inom individen (CV_I) och variation mellan individer (CV_G), genom att dividera kvadratroten av respektive varians med medelvärdet för alla provresultaten och multiplicera med 100 för att få fram coefficients of variation (CV-värden) i procent för respektive variabel (Fraser & Harris, 1989).

Index of Individuality räknades ut med hjälp av formeln $IND_I = (CV_I^2 + CV_A^2)^{1/2}/CV_G$ (Harris, 1981; Fraser, 2004). Reference Change Values räknades ut med hjälp av formeln $RCV = 2^{1/2} * Z * (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$, med z-värden för 95% probabilitet, samt bilateralt och unilateralt (Fraser, 2001). Kvalitetsmål för CV_A räknades ut enligt följande: För optimal prestanda användes formeln $CV_{OPT} < 0,25 * CV_I$, för önskvärd prestanda formeln $CV_{DES} < 0,5 * CV_I$, samt för lägsta acceptabla prestanda $CV_{MIN} < 0,75 * CV_I$ (Cotlove, 1970; Fraser, 1997).

RESULTAT

Hundarna

Initialt rekryterades 19 hundar till studien, men 9 exkluderades av olika skäl: 1 hund på grund av stress vid blodprovstagningen (vilken avbröts), 2 hundar på grund av avvikelser på blodprov (en med högt ALAT och protein, en med högt kreatinin), 3 hundar på grund av riklig mängd vita blodkroppar i urinen (>30 per synfält i 40 gångers förstoring) på flera urinprover, 2 tikar på grund av att de började löpa under studiens gång, samt 1 hund för att den deltog i en annan studie och genomgick en scintigrafi under studiens gång.

Tre hundar hade vid blodprovstagning lindrigt förhöjt CRP (CRP<30 mg/L). På dessa hundar togs nya blodprover vid den andra kliniska undersökningen i slutet av studien, och samtliga hade vid det tillfället normala CRP-värden (dvs CRP<7 mg/L). En hund hade lågt antal vita blodkroppar och neutrofiler på blodbilden; denna hund hade vid deltagande i en annan studie 1 år tidigare konstaterats ligga lågt även då. Dessa avvikelser bedömdes sakna klinisk relevans och hundarna exkluderades således inte ur studien.

De kvarvarande 10 hundarna var 2,7–8,4 år gamla (genomsnitt: 5,5 år. Standardavvikelse (SD): 2,1 år) och av följande raser: 2 labrador retrievers, 2 Jack Russell terriers, 1 bearded collie, 1 schäfer, 1 alaskan husky och 3 blandraser. Av dessa hundar var 4 hanhundar (4 kasttrade, varav 1 kemiskt) och 6 tikar (3 kasttrade). Hundarna vägde i genomsnitt 22,6 kg (SD: 9,7 kg), med total spridning 6,5–34,0 kg. Samtliga djurägare och hundar bodde i eller i närheten av Uppsala.

Uppehåll i insamlingen av urinprover gjordes för 4 hundar. För en av dessa gjordes 2 uppehåll varav ett på 3 tillfällen (1,5 vecka). Alla deltagande hundar lämnade totalt 10 prover. Samtliga prover frystes ned inom maximalt 7 h från att de tagits, och förvarades i frys i maximalt 8 veckor innan analys. Den specifika vikten på urinen var i genomsnitt 1,044 (SD: 0,009), med en total spridning på 1,024–1,064.

Biologisk variation

Inga outliers identifierades. Residualerna bedömdes vara normalfördelade. Resultaten gällande den biologiska variationen, i form av medeltal, standardavvikelse och uträknade CV_I , CV_G och CV_A , presenteras i Tabell 2. Den biologiska variationen (CV_I och CV_G) var i storleksordningen 15-30%, och den analytiska variationen (CV_A) i storleksordningen 3-6%, för samtliga variabler. För kreatinin var CV_I större än CV_G , men för protein och UPC var CV_I istället mindre än CV_G .

Uträknade IND_I , RCV och kvalitetsmål för CV_A presenteras i Tabell 3. Index of Individuality var högt för kreatinin, intermediärt för protein och lågt för UPC (Fraser & Harris, 1989; Fraser, 2004). Reference change values indikerar att det för samtliga variabler krävs skillnader på nära eller över 50% för att en skillnad skall vara statistiskt signifikant (Fraser, 2001). Gällande kreatinin och UPC var RCV mycket lika, medan RCV för protein var högre. Även gällande

kvalitetsmålen för CV_A ligger kreatinin och UPC mycket lika (kring 5% för CV_{OPT}), medan kvalitetsmålen för protein tillåter något större imprecision.

Tabell 2. Data på biologisk variation av kreatinin, protein och UPC i urin hos 10 friska hundar

Analyt	Enhet	Medeltal (min-max)	SD	CV_I (%)	CV_G (%)	CV_A (%)
Kreatinin	$\mu\text{mol/L}$	19702 (8319-33714)	4932	20,6	14,7	3,0
Protein	g/L	0,12 (0,02-0,31)	0,051	28,1	33,1	5,6
UPC	-	0,054 (0,014-0,147)	0,020	20,1	33,2	5,0

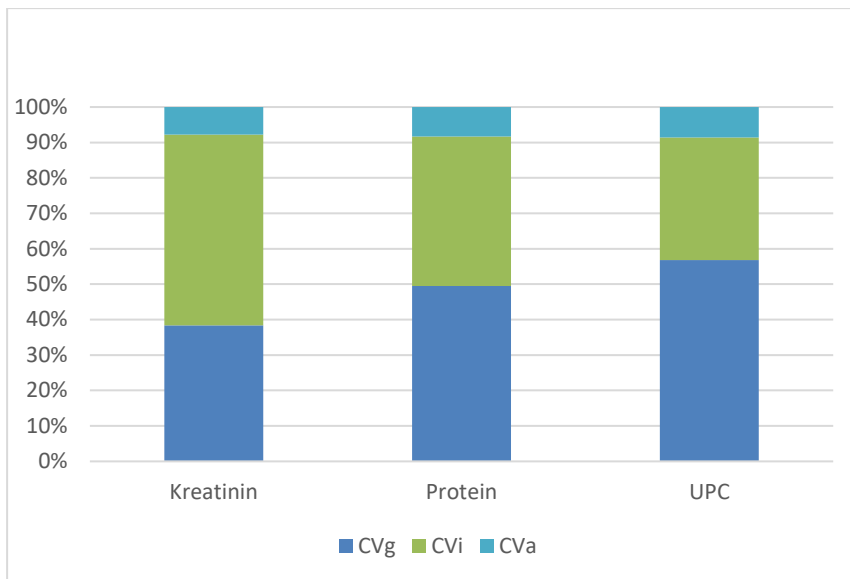
UPC = Urinprotein/urinkreatinin-kvot. Talen inom parentes efter medeltal är lägsta respektive högsta värde. SD = Standardavvikelse. CV_I = genomsnittlig biologisk variation inom individen. CV_G = biologisk variation mellan individer. CV_A = analytisk variation, imprecision.

Tabell 3. Uträknade IND_I , RCV och kvalitetsmål för CV_A uträknade från resultaten i tabell 2

Analyt	IND_I	RCV_1 (%)	RCV_2 (%)	CV_{OPT} (%)	CV_{DES} (%)	CV_{MIN} (%)
Kreatinin	1,4	48,6	57,7	5,1	10,3	15,5
Protein	0,9	66,9	79,4	7,0	14,1	21,1
UPC	0,6	48,3	57,4	5,0	10,1	15,1

UPC = Urinprotein/urinkreatinin-kvot. IND_I = Index of Individuality, baserat på $(CV_I^2 + CV_A^2)^{1/2} / CV_G$. RCV_1 = Reference change value för unilaterala förändringar, baserat på $2^{1/2} * 1,65 * (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$. RCV_2 = Reference change value för bilaterala förändringar, baserat på $2^{1/2} * 1,96 * (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$. CV_{OPT} = Optimal prestanda för imprecision (CV_A), baserat på $CV_{OPT} < 0,25 * CV_I$. CV_{DES} = Önskvärd prestanda för imprecision (CV_A), baserat på $CV_{DES} < 0,5 * CV_I$. CV_{MIN} = Lägsta acceptabla prestanda för imprecision (CV_A), baserat på $CV_{MIN} < 0,75 * CV_I$.

I figur 1 illustreras hur variationen inom respektive variabel var fördelad mellan variation inom individen (CV_I), variation mellan individer (CV_G) och analysvariation (CV_A).



Figur 1. Fördelning av variation inom variablerna kreatinin, protein samt UPC.

UPC = Urinprotein/Urinkreatinin-kvot. $CV_g = CV_G$, variationen mellan individer, $CV_i = CV_I$, den genomsnittliga variationen inom individer. $CV_a = CV_A$, den analytiska variationen eller imprecisionen.

DISKUSSION

Resultaten i denna studie indikerar att urinprotein hade en sammantaget större biologisk variation än urinkreatinin, med både högre CV_I och högre CV_G . Den biologiska variationen av UPC baseras på data från protein och kreatinin, eftersom UPC är kvoten mellan dem, och låg i samma storleksordning som protein när det gäller CV_G , men hade en lägre CV_I än protein.

Imprecisionen, eller CV_A , var för samtliga variabler mindre än eller lika det för kvalitetsmål uträknade optimala CV_A , och således bidrog analysmetodens imprecision med endast en liten variabilitet (Fraser *et al.*, 1997). Detta illustreras också i figur 1, där det framgår att större delen av variationen bestod av CV_I och CV_G i olika proportioner, medan CV_A bidrog med endast en liten och för de olika variablerna ungefär lika stor andel av variationen. Detta gör datan på biologisk variation som denna studie producerat relativt pålitlig avseende imprecision. Dock är det viktigt att notera att det uträknade CV_A -värdet gäller just denna analysmetod samt i denna specifika studiesituation, där analysvariationen har minimerats genom att alla prover kördes i en analysomgång. Därför kan CV_A skilja sig åt för andra laboratorier och även för detta laboratorium, när prover inte körs i en enda analysomgång. Således kan detta CV_A inte användas generellt för uträkningar där CV_A krävs. Ett aktuellt CV_A hämtas istället ur det aktuella laboratoriets interna kontroll, för t.ex. RCV (Ricós *et al.*, 2004).

IND_I för kreatinin låg precis på gränsen till att vara högt (IND_I var 1,4 för kreatinin i denna studie, och IND_I är högt när det är $>1,4$), och kreatinin har således relativt låg individualitet och lämpar sig relativt väl för populationsbaserade RI (Fraser, 2004). För protein låg IND_I intermediärt (0,9) och således är populationsbaserade RI mindre pålitliga än för kreatinin (Walton, 2012). IND_I för UPC låg precis på gränsen till att vara lågt (IND_I var 0,6 för UPC, och IND_I är lågt när det är $<0,6$), och UPC har således relativt hög individualitet och populationsbaserade RI har begränsat värde (Fraser, 2004). Dessa skillnader illustreras också i figur 1, där det framgår att för kreatinin utgjordes största delen av variationen av CV_I , men för UPC utgjordes största delen av variationen av CV_G . Eftersom den enda av de undersökta variablerna för vilken populationsbaserade RI är lämpliga är just urinkreatinin, som kliniskt sett inte används ensamt utan just i kvoter såsom UPC, är det värt att notera att det höga IND_I för urinkreatinin alltså inte gjorde IND_I för UPC högt. Detta kan bero på att urinkoncentrationen påverkar UPC mindre än den påverkar kreatinin och protein, vilket gör att skillnaden mellan individerna får större betydelse för UPC. Med andra ord ger CV_G större utslag i IND_I för UPC. För protein och UPC är således populationsbaserade RI av begränsat eller lågt värde, och när möjligt kan istället RCV användas för att utvärdera proteinuri och storleken av proteinuri, t.ex. för att fastställa huruvida en patient har en njurskada eller för att övervaka hur en sådan utvecklas.

Uträknade RCV indikerar att det för samtliga variabler krävs relativt stora förändringar, nära eller över 50% förändring, för att skillnaden mellan två prover hos samma individ med hög sannolikhet (95%) ska representera en reell biologisk skillnad och inte bero på slumpmässig variation. Det krävs större förändringar för att identifiera en signifikant skillnad för urinprotein än för UPC, vilket inte är förvånande eftersom urinprotein påverkas även av urinens

koncentration. Dock krävs även för UPC relativt stora förändringar. Värt att notera är att dessa RCV baseras på det för studien uträknade CV_A (se diskussion kring CV_A ovan). Detta innebär att uträknade RCV från denna studie bara är aktuella om CV_A -värdet är detsamma som i denna studie. Om det aktuella laboratoriets CV_A är större än i denna studie blir även RCV något större. Ska RCV användas i en klinisk situation kan det alltså vara nödvändigt att räkna ut ett eget RCV för aktuellt laboratorium. Dock ger RCV från denna studie en uppfattning om vilken storleksordning på skillnad mellan två prover som krävs för att skillnaden ska vara signifikant, under förutsättning att CV_A är i samma storleksordning.

Studien har tagit fram analytiska kvalitetsmål för analysmetodens imprecision (CV_A) på tre nivåer, optimalt (CV_{OPT}), önskvärt (CV_{DES}) och lägsta acceptabla (CV_{MIN}). Varje laboratorium kan implementera det av dessa kvalitetsmål som är uppnåeligt för dem, baserat på de CV_A -värden deras interna kontroll uppvisar. Storleksordningen på kvalitetsmålen är likartade, men något högre imprecision kan accepteras för protein jämfört med kreatinin och UPC, enligt denna studies resultat.

Resultaten i studier som undersökt kreatinin och/eller totalprotein i blod hos hund har inte varit helt samstämmiga (Leissing *et al.*, 1985, se: VetBiologicalVariation.org, 2015; Jensen & Aaes, 1993, se: VetBiologicalVariation.org, 2015; Pagitz *et al.*, 2007; Ruaux *et al.*, 2012). De flesta av studierna är gjorda på försökshundar och oftast beaglar. Det är enligt Ruaux *et al.* (2012) rimligt att variationen mellan individer (CV_G) är mindre i en sådan grupp än i en grupp av privatägda hundar av varierande raser, vilket också skulle resultera i ett högre IND_I . Samma författare påpekar också att en grupp privatägda hundar av varierande raser sannolikt är mer representativ för, och ett IND_I genererat av att studera en sådan grupp mer applicerbart på, hundar som inkommer till en klinik. Således förefaller det rimligast att jämföra resultaten i vår studie med resultaten från den av dessa studier som undersökt privatägda hundar av varierande raser, vilket är studien av Ruaux *et al.* (2012). Urinprotein hade i vår studie ett CV_I på 28,1 % och ett CV_G på 33,1%, vilket var klart högre än det CV_I på 5,3% och CV_G på 12,0% för totalprotein i blod den studien rapporterat. Att den biologiska variationen var större i urin var väntat, eftersom variablerna i urin till stor del påverkas av hur utspädd urinen är. För kreatinin var situationen för CV_I likartad, då vår studies CV_I på 20,6% för urinkreatinin var klart högre än det CV_I på 6,6% som rapporterats i studien av Ruaux *et al.* (2012). Däremot avviker CV_G för kreatinin från detta mönster, då vår studies CV_G på 14,7% var klart lägre än det CV_G på 31,0% den tidigare studien rapporterat (Riaux *et al.*, 2012). Det har tidigare konstaterats att rapporterade CV_G -värden för människor har skiljt sig åt mellan olika studier, och att detta tyder på att när den biologiska variationen utvärderas kan CV_G påverkas av bland annat antalet studiedeltagare eller den analytiska variationen i studien (Rícos *et al.*, 1994). Det är möjligt att dessa eller andra faktorer påverkat resultatet av CV_G för kreatinin i vår studie och/eller studien av Ruaux *et al.* (2012), och det är därför oklart hur pålitliga dessa CV_G -värden är. Studierna har samlat prov från ett likartat antal hundar (11 respektive 10), men CV_A var mer än dubbelt så stort i studien av Ruaux *et al.* (2012), 7,5% jämfört med 3,0% i vår studie. Ytterligare en faktor som kan ha påverkat resultatet av CV_G är spridningen av storlek och muskelmassa hos studiedeltagarna. Det är rimligt att CV_G för kreatinin påverkas av detta, eftersom mängden

tillverkad kreatinin påverkas av muskelmassan (IRIS, 2015). Detta illustreras också av att studien av Ruaux *et al.* (2012), vilken som sagt undersökt hundar av varierande raser, fått fram ett högre CV_G för kreatinin i blod än flera studier som undersökt bara eller till största delen beaglar (Leissing *et al.*, 1985, se: VetBiologicalVariation.org, 2015; Pagitz *et al.*, 2007). Ruaux *et al.* (2012) har inte angett vilka vikter de deltagande hundarna hade men studiens minsta respektive största hund förefaller ha varit en Pomeranian-korsning respektive en Dogo Argentino, vilket borde innebära ett större viktspann i den studien än i vår studie. Även om det är oklart hur detta påverkar kreatinin i urin talar detta således för att vår studie kan ha underskattat CV_G för urinkreatinin.

Av studierna som undersökt biologisk variation av urinprotein och urinkreatinin hos människa är det en, Ricós *et al.* (1994), som liksom vår studie undersökt morgonurin. Resultaten i vår studie och för morgonurin i studien av Ricós *et al.* (1994) var i samma storleksordning, vilket stödjer resultaten i vår studie, men de var inte identiska. För kreatinin var CV_I 20,6% och CV_G 14,7% i vår studie, vilket var något lägre än det CV_I på 31% och CV_G på 26% som studien på människor fått fram. Även uträknade IND_I för kreatinin skiljer sig åt, då IND_I i vår studie var 1,4 och således precis på gränsen till att vara högt, medan IND_I i studien på människor var intermediärt (dock i det övre spannet av intermediärt, 1,2). För protein var vår studies CV_I på 28,1% och CV_G på 33,1% också lägre än de 48% respektive 38% som studien på människor visade. Båda studierna gav intermediära IND_I för protein. De var dock inte identiska inom spannet för intermediära IND_I , utan vår studies IND_I på 0,9 för protein förefaller betydligt lägre än det IND_I på 1,3 som beräknades i studien av Ricós *et al.* (1994). Det är möjligt att ett högre antal studiedeltagare skulle öka CV_G för hundar av både kreatinin och protein till värden mer näraliggande resultaten från studien av Ricós *et al.* (1994), då den senare studien hade fler deltagare (53 stycken) och deltagarantalet som tidigare noterats eventuellt kan påverka vilket CV_G en studie får fram (Ricós *et al.*, 1994). Detta skulle i så fall också sänka IND_I för dessa variabler. För människor har generellt högre IND_I (eller motsvarande) uppnåtts med 24h samlingsprover än med morgonurin (Shephard *et al.*, 1981; Gowans & Fraser 1987; 1988; Ricós *et al.*, 1994), och det är möjligt att även hundar skulle få högre IND_I om 24h samlingsprover användes. Då insamling av 24h samlingsprover hos hund är komplicerat (McCaw *et al.*, 1985) förefaller det dock inte rimligt att samla 24h samlingsprover hos hund på grund av detta.

Då enbart en studie undersökt just morgonurin för protein och kreatinin hos människor (Ricós *et al.*, 1994) är det inte säkert att resultaten från den studien faktiskt är representativa för den mänskliga populationen, och på samma vis behövs fler studier för att konfirmera resultaten hos hund från vår studie. Dock stöds resultaten i studien av Ricós *et al.* (1994) av att resultaten för 24h samlingsprov i den studien är i samma storleksordning som i andra studier på 24h samlingsprov (Shephard *et al.*, 1981; Gowans & Fraser, 1987;1988). Studierna på människor (Shephard *et al.*, 1981; Gowans & Fraser, 1987;1988; Ricós *et al.*, 1994) har begränsningen att de är relativt gamla och delvis inte använder de idag vedertagna eller föredragna metoderna för att undersöka och presentera biologisk variation.

Inga tidigare publicerade studier har undersökt den biologiska variationen av urinprotein/urinkreatinin-kvoten, varken för hundar eller för människor. Det är heller inte, såvitt undertecknad författare känner till, beskrivet hur kvoter bör hanteras i studier av biologisk variation. I denna studie har UPC behandlats på samma sätt som övriga variabler.

Alla prover frystes ner och förvarades i $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ innan de analyserades i duplikat i randomiserad ordning i en analysomgång, vilket enligt Fraser & Harris (1989) är det lämpligaste tillvägagångssättet och har fördelarna att variation mellan analysomgångar elimineras samt att analysen i duplikat ger ett mått på analysvariationen inom analysomgången. Enligt Fraser (2004) bör också den preanalytiska variationen minimeras, vilket i denna studie gjorts genom att enbart morgonurin samlats och genom att djurägarna instruerades att träna på urinprovstagning innan insamling till studien påbörjades. Fraser (2004) påpekar dock också att den preanalytiska variationen kan vara så stor att tillvägagångssätt som minimerar preanalytisk variation kan generera värden som inte är lämpliga för klinisk användning. Vidare är enligt Ruaux *et al.* (2012) privatägda hundar med varierande hemförhållanden och miljöfaktorer en lämpligare modell för hundar som inkommer till klinik än försökshundar. Undertecknad författare ser det därför som en fördel att vår studie använt spontankastade urinprov med morgonurin samlade av djurägarna själva, utan vidare standardisering av utfodring, tidpunkt, med mera, eftersom detta överensstämmer med hur prov kliniskt sett ofta samlas in. Således bedöms provmaterialet ha en även för kliniskt bruk rimlig preanalytisk variation, och genererade värden i form av RCVs samt övriga resultat bedöms vara tillämpliga för kliniskt bruk. Vidare bedöms studiepopulationen, privatägda hundar av varierande raser och åldrar, sannolikt vara representativ för populationen svenska friska hundar som helhet. Studiepopulationen var dock relativt liten och det kan inte uteslutas att den inte är representativ, och begränsningar i studien inkluderar att samtliga djurägare bodde i Uppsalaområdet.

Begränsningar av studien inkluderar också, som tidigare diskuterats, att uträknade RCV-värden enbart gäller när CV_A är i samma storleksordning som i studien och att CV_G kan ha underskattats bland annat på grund av ett relativt lågt antal studiedeltagare. Ytterligare begränsningar inkluderar att det för vissa hundar gjordes kortare uppehåll i insamlingen av urinprover, att proverna frystes in efter något olika lång tid beroende på bland annat hur lång tid som gick från att proven togs av djurägarna till att de lämnades in, och att förvaringstiden i frys var längre för de prov som samlades i början av studien än för de som samlades i slutet av studien. Dessutom har studien utvärderat biologisk variation över en period av mindre än 2 månader, och det är möjligt att den biologiska variationen skiljer sig sett över en längre tidsperiod. Dock har studier på människor utförda över olika tidsperioder enligt Fraser (2004) gett resultat av samma storlek. Studien hade också ett relativt stort bortfall; av 19 deltagande hundar exkluderades 9 av olika skäl.

Det är vidare värt att notera att trots att ingen av hundarna som inkluderades i studien uppvisade sjukdomstecken från urinvägarna, exkluderades 3 hundar på grund av att urinsedimentet f flera urinprov visade en inflammatorisk bild med >30 leukocyter per synfält i mikroskop. Dessa hundar exkluderades eftersom orsakerna till en sådan inflammatorisk bild också kan ge ökad

mängd protein i urinen (Lees *et al.*, 2005; DiBartola & Westropp, 2014), och medräknande av dessa hundar därmed hade kunnat ge missvisande resultat. Ur en klinisk synvinkel är det dock intressant att till synes friska hundar uppvisar detta utseende på urinsediment. Det skulle kunna försvåra bedömningen av dessa hundar om de utvecklar en klinisk sjukdom, om de vid veterinärbesök fortsatt har detta utseende på urinsedimentet utan att det är kopplat till den aktuella sjukdomen, eftersom urinprov från dessa hundar skulle kunna bedömas tyda på en inflammation i urin- eller könsvägar. Det är också möjligt att dessa hundar trots att de föreföll friska i själva verket hade ett subkliniskt sjukdomstillstånd någonstans i urin- eller könsvägarna.

Sammanfattningsvis indikerar resultaten i studien att populationsbaserade RI är lämpliga för urinkreatinin men av mer begränsat värde för urinprotein och av lågt värde för UPC. För att utvärdera proteinuri och storleken av proteinuri, t.ex. för att fastställa om patienten har en njurskada, kan däremot RCV med fördel användas när möjligt. Relativt stora förändringar krävs mellan två prover för att skillnaden med hög sannolikhet ska vara reell. De kvalitetsmål på olika nivåer denna studie tagit fram för CV_A kan implementeras av varje laboratorium utifrån vilka som är uppnåeliga. Då denna studie såvitt författaren känner till är ensamt i sitt slag för hund i nuläget krävs vidare studier för att bekräfta resultaten.

TACK

Tack till Claudia von Brömssen för hjälp med databehandling och statistisk analys samt till Agria och SKK forskningsfond för betalning av analyskostnader.

REFERENSER

- Bartlett, W.A., Braga, F., Carobene, A., Coşkun, A., Prusa, R., Fernandez-Calle, P., Røraas, T., Jonker, N. & Sandberg, S.; Biological Variation Working Group, European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). (2015). A checklist for critical appraisal of studies of biological variation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 53: 879-885.
- Carobene, A. (2015). Reliability of biological variation data available in an online database: need for improvement. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 53: 871-877.
- Cianciolo, R., Hokamp, J. & Nabity, M. (2016). Advances in the evaluation of canine renal disease. *The Veterinary Journal*, 215: 21-29.
- Cotlove, E., Harris, E.K. & Williams, G.Z. (1970). Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. *Clinical Chemistry*, 16: 1028-1032.
- Cowan, S.M., Bartges, J.W., Gompf, R.E., Hayes, J.R., Moyers, T.D., Snider, C.C., Gerard, D.A., Craft, R.M., Muenchen, R.A. & Carroll, R.C. (2004). Giant platelet disorder in the Cavalier King Charles Spaniel. *Experimental Hematology*, 32: 344-350.
- D'Amico, G. & Bazzi, C. (2003). Pathophysiology of proteinuria. *Kidney International*, 63: 809-825.
- DiBartola, S.P. & Westropp, J.L. (2014). Diagnostic tests for the urinary system. I: Nelson, R.W. & Couto, C.G., (ed.). *Small Animal Internal Medicine*. 5. ed. St. Louis: Elsevier, 638-652.
- EFLM, European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (2016). *News, Working Group: Biological Variation*.
<http://eflm.eu> EFLM Committees/Science/WG: Biological Variation/News [2016-11-08]
- Fraser, C.G. (2001). *Biological variation: From principles to practice*. Washington, DC: AACC Press.
- Fraser, C.G. (2004). Inherent biological variation and reference values. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42: 758-764.
- Fraser, C.G. & Harris, E.K. (1989). Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 27: 409-437.
- Fraser, C.G., Hyltoft Petersen, P., Libeer, J-C. & Ricos, C. (1997). Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. *Annals of Clinical Biochemistry*, 34: 8-12.
- Friedrichs, K.R., Harr, K.E., Freeman, K.P., Szladovits, B., Walton, R.M., Barnhart, K.F. & Blanco-Chavez, J. (2012). ASVCP reference interval guidelines: Determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, 41: 441-453.
- Gowans, E.M.S. & Fraser, C.G. (1987). Biological variation in analyte concentrations in urine of apparently healthy men and women. *Clinical Chemistry*, 33: 847-850.
- Gowans, E.M.S. & Fraser, C.G. (1988). Biological variation of serum and urine creatinine and creatinine clearance: ramifications for interpretation of results and patient care. *Annals of Clinical Biochemistry*, 25: 259-263.

- Harris, E.K. (1981). Statistical aspects of reference values in clinical pathology. *Progress in Clinical Pathology*, 8: 45-66.
- Harris, E.K. & Yasaka, T. (1983). On the calculation of a "reference change" for comparing two consecutive measurements. *Clinical Chemistry*, 29: 25-30.
- IRIS, International Renal Interest Society (2013). *Proteinuria, Measurement and interpretation of proteinuria and albuminuria*.
<http://iris-kidney.com/education/proteinuria.html> [2016-11-11]
- IRIS, International Renal Interest Society (2015). *Creatinine (Dog), Interpreting blood creatinine concentration in dogs*.
http://iris-kidney.com/education/creatinine_dogs.html [2016-11-11]
- Jensen, A.L. & Aaes, H. (1993). Critical differences of clinical chemistry parameters in blood from dogs. *Research in Veterinary Science*, 54: 10-14.
- Kenny, D., Fraser C.G., Hyltoft Petersen, P. & Kallner, A. (1999). Consensus agreement. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 59: 585.
- Kjelgaard-Hansen, M. & Jensen, A.L. (2010). Subjectivity in defining quality specifications for quality control and test validation. *Veterinary Clinical Pathology*, 39: 133-135.
- Lees, G.E., Brown, S.A., Elliott, J., Grauer, G.F. & Vaden, S.L. (2005). Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM forum consensus statement (small animal). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19: 377-385.
- Leissing, N, Izzo, R. & Sargent, H. (1985). Variance estimates and individuality ratios of 25 serum constituents in Beagles. *Clinical Chemistry*, 31: 83-86.
- McCaw, D.L., Knapp, D.W. & Hewett, J.E. (1985). Effect of collection time and exercise restriction on the prediction of urine protein excretion, using urine/creatinine ratio in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 46: 1665-1669.
- Pagitz, M., Frommlet, F. & Schwendenwein, I. (2007). Evaluation of biological variance of cystatin C in comparison with other endogenous markers of glomerular filtration rate in healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21: 936-942.
- Pedersen, H.D., Häggström, J., Olsen, L.H., Christensen, K., Selin, A., Burmeister, M.L. & Larsen, H. (2002). Idiopathic asymptomatic thrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels is an autosomal recessive trait. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16: 169-173.
- Ricós, C., Cava, F., García-Lario, J.V., Hernández, A., Iglesias, N., Jiménez, C.V., Minchinela, J., Perich, C., Simón, M., Domenech, M.V. & Álvarez, V. (2004). The reference change value: a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 64: 175-184.
- Ricós, C., Jiménez, C.V., Hernández, A., Simón, M., Perich, C., Alvarez, V., Minchinela, J. & Maciá, M. (1994). Biological variation in urine samples used for analyte measurements. *Clinical Chemistry*, 40: 472-477.

- Ruaux, C.G., Carney, P.C., Suchodolski, J.S. & Steiner, J.M. (2012). Estimates of biological variation in routinely measured biochemical analytes in clinically healthy dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 41: 541-547.
- Shephard, M.D.S., Penberthy, L.A. & Fraser, C.G. (1981). Short- and long-term biological variation in analytes in urine of apparently healthy individuals. *Clinical Chemistry*, 27: 569-573.
- VetBiologicalVariation.org (2015). *Database tables, Dog*.
<http://vetbiologicalvariation.org/database-tables-dog> [2016-12-04]
- Walton, R.M. (2012). Subject-based reference values: biological variation, individuality, and reference change values. *Veterinary Clinical Pathology*, 41: 175-181.